製品コード RR240A

食品・環境分析用

TaKaRa

Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit

説明書

v201406Da

本製品は、リアルタイム PCR により一般細菌数を定量するためのキットです。2 ～ 4 日の培養を必要とする従来法に比べて迅速に結果を得ることができ、食品・環境分野の自主管理等に有用です。また、従来法では菌種によって最適な培養条件が異なるため、検体の種類や貯蔵条件等を考慮し、検体に存在する菌種に応じて培地組成や培養温度を工夫する必要がありますが [1-3]、本製品では一度に広範な細菌種を測定することができます。

検出対象遺伝子について

細菌全般を対象とした PCR 検出系としては、16S rRNA 遺伝子を利用したものが知られていますが、16S rRNA は菌種間でコピー数が異なるので正確な定量には適しません。本製品では、菌種間での保存性が高く、染色体上に低コピー（1 または 2 コピー）で存在しているタンパク質伸長因子 Tu（*tuf*）遺伝子を検出対象としています [4]。

リアルタイム PCR 法について

リアルタイム PCR は、PCR 増幅の過程を蛍光物質によりリアルタイムでモニタリングする迅速性と定量性に優れた遺伝子検出法です。本製品に含まれる SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC は、SYBR Green I を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR 試薬で、GC 含量が高い配列でも良好に増幅できるため広範な細菌種の検出に適しています。

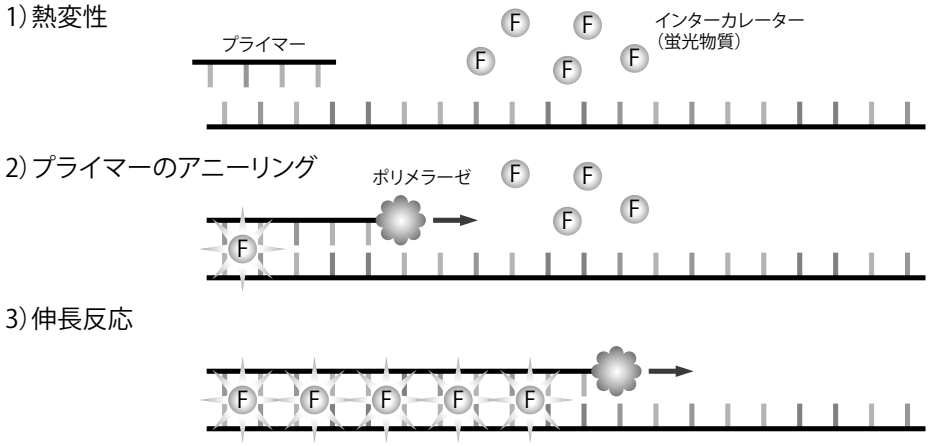


図 1. インターカレーター法の原理

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター）を反応液に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。

※ 本キットの開発には、東京海洋大学 木村凡先生、高橋肇先生、東洋水産株式会社 田中悠一郎氏にご協力いただきました。

I. キットの内容（25 μl 反応、100 回分）

SYBR *Premix Ex Taq* GC＊1	2 × conc.	625 μl × 2
TUF Primer Mix	5 × conc.	250 μl × 2
dH_2O		1 ml
ROX Reference Dye＊2	50 × conc.	50 μl
ROX Reference Dye II＊2	50 × conc.	50 μl
TUF Positive Control	1 × 10^5 copies/μl	100 μl
EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml × 2

＊1：*TaKaRa Ex Taq* HS、dNTP Mixture、Mg^{2+} および SYBR Green I を含む。

＊2：Life Technologies のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye（50 ×）を添加する機種
- StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ ROX Reference Dye II（50 ×）を添加する機種
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies）
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）

◆ 添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）

II. 輸送と保存

輸送　－ 20℃ / － 80℃

保存　SYBR *Premix Ex Taq* GC（Package 1）

4℃保存：6 ヵ月安定（長期保存は－ 80℃）
必ず遮光して保存してください。また、4℃保存する場合には、コンタミネーションに十分注意してください。

※ 長期保存する際は、－ 80℃で保存してください。（－ 20℃保存は避けてください。）
いったん融解したものは 4℃で保存し、6 ヵ月を目処にご使用ください。

その他のコンポーネント（Package 2）

－ 20℃保存

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

＜サンプル懸濁液調製に必要なもの＞

希釈水（0.1% ペプトン加生理食塩水等、検体の種類に応じて選択）
ストマッカーおよびストマッカー袋

＜ DNA 抽出に必要なもの＞

NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）
特級エタノール（＞ 99%）
ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
微量高速遠心機
20 mg/ml lysozyme in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100（pH8.0）

＜リアルタイム PCR に必要なもの＞

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）
StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）など
卓上遠心器
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

IV. 使用上の注意

本キットを使用する際の注意事項です。<u>使用前に必ずお読みください。</u>

[使用に際して]

1. 使用目的：本キットは食品・環境分析に使用する製品です。

2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、死菌も検出されます。従って、生菌のみの検出結果が必要な場合は、培養法による検査も行い、結果を判定してください。（検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は、一切の責任を負いません。）

3. 廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

[操作上の注意]

1. SYBR *Premix Ex Taq* GC は、泡立てないように緩やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。
   なお、SYBR *Premix Ex Taq* GC を－ 80℃で保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿が生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。

3. SYBR *Premix Ex Taq* GC は、SYBR Green I を含んでいます。反応液調製時に強い光を当てないよう注意してください。

4. 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

V. 操作

操作の概要

サンプル懸濁液の調製

検体 10 g ＋希釈水 90 ml

↓

ストマッカー処理

↓

DNA 抽出

試料原液 1 ml（検体 0.1 g 相当量）を 8,000 × *g* で 5 分遠心し、上清を除去する。

↓

NucleoSpin Tissue による DNA 抽出（最終液量 100 μl）

↓

リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

TUF Positive Control を段階希釈し、検量線作成用スタンダードを調製する。

↓

反応液を調製する。

↓

反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、検量線作成用スタンダード、または検体サンプル 5 μl（検体 0.005 g 相当量）を添加する。

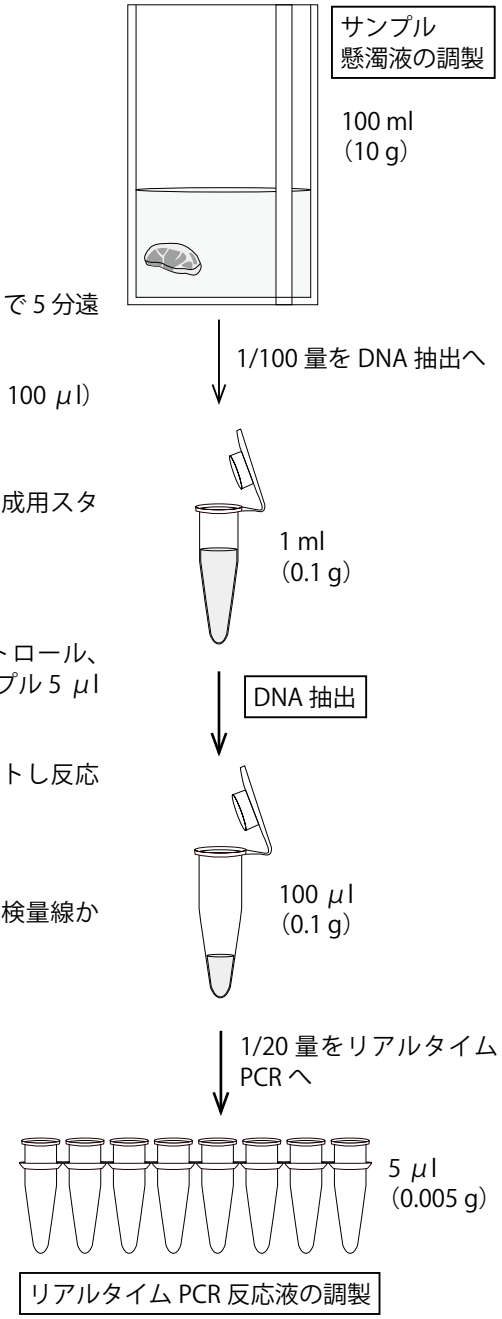
↓

反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。

↓

定量解析

リアルタイム PCR 装置の解析ソフトにより、検量線から検体サンプルの定量結果が算出される。



V-1. サンプル懸濁液の調製（エリア 2 で実施）

検体 10 g に 90 ml の希釈水（0.1% ペプトン加生理食塩水等）を加え、必要に応じてストマッカー処理等を行ったものを試料原液とする。

1. 検体を 10 g 秤量し、ストマッカー袋等へ移す。
2. 検体の 9 倍量に相当する 90 ml の希釈水を加える。
3. 必要に応じてストマッカー等を用いてホモジネートしたものを試料原液とする。

V-2. DNA 抽出（エリア 2 で実施）

試料原液 1 ml を 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。NucleoSpin Tissue の細菌（グラム陽性菌）用プロトコールに従って DNA 抽出を行い、100 µl で溶出する。

1. 試料原液 1 ml を 1.5 ml マイクロチューブに分取する。
2. 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。
3. 細菌を含むペレットを 20 mg/ml lysozyme in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100（pH8.0）*1 180 µl に懸濁し、37℃で 30 ～ 60 分インキュベートする。
4. Proteinase K*2 25 µl を添加し、56℃で 1 ～ 3 時間（または一晩）完全に溶解するまでインキュベートする。
5. サンプルを撹拌する。Buffer B3 200 µl を加えて、激しく撹拌した後、70℃で 10 分間インキュベートする。不溶物が残る場合は、11,000 × *g*、5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。
6. エタノール（> 99%）210 µl を添加し、よく混合する。
7. NucleoSpin Tissue Column を Collection Tube にセットする。6. の溶液をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
8. <u>1 回目の洗浄</u>：
   Buffer BW 500 µl をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。
   ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。

   <u>2 回目の洗浄</u>：
   Buffer B5*3 600 µl をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。
   ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
9. カラムを 11,000 × *g*、1 分間遠心する。
10. カラムを 1.5 ml マイクロチューブ（各自で用意）にセットする。70℃に温めた Buffer BE 100 µl を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 × *g*、1 分間遠心する。溶出した DNA 溶液は 4℃で保存する。（長期保存の場合は－ 20℃で保存し、凍結融解はできるだけ繰り返さない。）

＊ 1：NucleoSpin Tissue には含まれないため、別途用意する。

＊ 2：Proteinase K 溶液の調製法

<u>製品コード 740952.10 の場合：</u>

Proteinase K（凍結乾燥品）6 mg に Proteinase Buffer PB 260 µl を加えて完全に溶解する。調製した Proteinase K 溶液は、－ 20℃で保存する（6 ヵ月安定）。

＊ 3：Buffer B5 の調製法

<u>製品コード 740952.10 の場合：</u>

Wash Buffer B5（concentrate）4 ml に、エタノール（96 ～ 100%）16 ml を添加する。

V-3. リアルタイム PCR

V-2. で調製した DNA 溶液の内、5 μl を鋳型としてリアルタイム PCR を行う。同時に検量線作成用スタンダードの反応を実施する。

1. 検量線作成用スタンダードの調製（エリア 3 で実施）

   TUF Positive Control を EASY Dilution で段階希釈し、検量線作成用スタンダードとする。（リアルタイム PCR には、1 反応当りそれぞれ 5 μl を使用する。）

   （1）1×10^5 copies/μl（TUF Positive Control 原液）
   （2）1×10^4 copies/μl（TUF Positive Control 原液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）
   （3）1×10^3 copies/μl（2. の 1×10^4 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）
   （4）1×10^2 copies/μl（3. の 1×10^3 copies/μl 溶液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl）

   リアルタイム PCR を実施する際に、スタンダードの値を copies/g の単位で入力しておくと、反応終了後、定量値を検体 1 g 当りのコピー数として得ることができる。（定量の原理等については「VI. 定量解析」の項を参照）

   表 1. copies/tube と copies/g の対応表

	copies/tube （1 反応当りのコピー数）	copies/g （検体 1g 当りのコピー数）
1	5×10^5	1×10^8
2	5×10^4	1×10^7
3	5×10^3	1×10^6
4	5×10^2	1×10^5

2. 反応液の調製（エリア 1 で実施）

   下記に示す反応液を氷上で調製する。
   鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして滅菌水 5 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。

【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

	[1 反応]
SYBR *Premix Ex Taq* GC（2 × conc.）	12.5 μl
TUF Primer Mix（5 × conc.）	5.0 μl
dH_2O	2.5 μl
鋳型	（5.0 μl）
Total	25.0 μl

【Life Technologies のリアルタイム PCR 装置の場合】

	[1 反応]
SYBR *Premix Ex Taq* GC（2 × conc.）	12.5 μl
TUF Primer Mix（5 × conc.）	5.0 μl
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II＊1	0.5 μl
dH_2O	2.0 μl
鋳型	（5.0 μl）
Total	25.0 μl

＊1：StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用する。

3. 鋳型（DNA 溶液）の添加（エリア 3 で実施）

2. で分注した反応液に、検体 DNA 溶液や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉める。
蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないよう注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心器で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

4. リアルタイム PCR 反応の開始

以下の PCR 条件でリアルタイム PCR を実施する。

※リアルタイム PCR 装置の操作方法は、各機種の取扱説明書をご参照ください。

初期変性
　95℃　30 秒
2 Step PCR
　35 サイクル
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒（蛍光検出：FAM/SYBR）
融解曲線分析

（注意）本製品を用いて増幅した PCR 産物は菌種により内部配列が異なる可能性があるため、検量線作成用スタンダードと実サンプルで増幅産物の Tm 値が異なる場合がありますが、定量には問題ありません。

VI. 定量解析

VI-1. 定量の原理

TUF Positive Control について

本製品に含まれる TUF Positive Control は、*tuf* 遺伝子の該当領域を搭載したプラスミド DNA であり、OD_{260} 値より換算した値で 1×10^5 copies/μl に調整されています。段階希釈物を検量線作成用スタンダードとして使用し、定量解析を行うことができます。
（ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合は、培養法による検査も行う必要があります。）

検体 1 g 当りのコピー数への換算

本製品の説明書に従って操作すると、リアルタイム PCR へは検体 0.005 g 相当量を使用することになりますので、その値を 200 倍すると検体 1 g 当りのコピー数となります。

検体 10 g ＋希釈水 90 ml
↓ ストマッカー処理
試料原液 1 ml（検体 0.1 g 相当量）
↓ DNA 抽出
DNA 溶液 100 μl（検体 0.1 g 相当量）
↓ 1/20 をリアルタイム PCR へ
リアルタイム PCR に使用 5 μl／反応（検体 0.005 g 相当量）

VI-2. 定量解析の手順

検体 1 g 当りのコピー数として定量する方法（標準）

1. スタンダードの値を copies/g 単位で入力する。
2. 定量結果は、検体 1 g 当りのコピー数（copies/g）として表示される。

1 反応当りのコピー数として定量し、検体 1 g 当りのコピー数に換算する方法（オプション）

1. スタンダードの値を copies/tube 単位で入力する。
2. 定量結果は、1 反応当りのコピー数（copies/tube）として表示される
3. 検体 1 g 当りのコピー数（TUF Positive Control 相当数）を算出する。
   定量値 × 200 ＝検体 1 g 当りのコピー数（copies/g）

VI-3. コピー数と菌数の相関について

純培養菌の場合

Rahnella aquatilis、*Escherichia coli* および *Staphylococcus aureus* 菌株を TSB 培地で一晩培養し、生理的食塩水でそれぞれ段階希釈して TSA 培地への塗沫培養により生菌数を求めた。また、各段階の菌液 1 ml を分取し、本製品の説明書に従いリアルタイム PCR 解析を実施した。

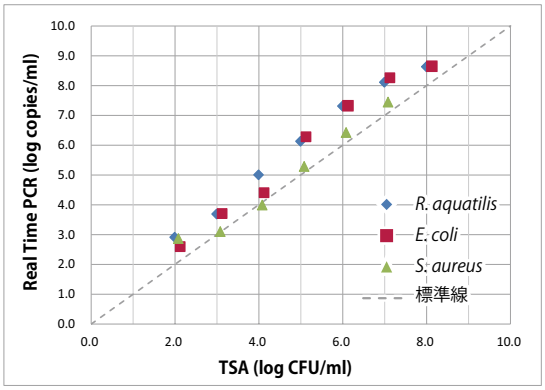


図 2. コピー数と菌数の相関（純培養菌）

TSA 塗沫培養の結果（菌数；CFU/ml）を横軸に、リアルタイム PCR の結果（コピー数；copies/ml）を縦軸にプロットした。TSA 塗沫培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方がやや高めに算出される傾向にあったが、その差異はほぼ 1 オーダー以内に収まった。

実検体の場合

野菜類 9 種、サラダ類（カット野菜含む）6 種、肉類 8 種につき、10% 懸濁液を調製し、TSA 塗沫培養（30℃、48 時間）による菌数測定と本製品によるリアルタイム PCR 解析を実施した。

表 2. コピー数と菌数（実検体）

	qPCR	TSA
	[log copies/g]	[log cuf/g]
キャベツ	1.51	0.90
水菜	3.38	3.20
もやし	4.61	3.30
チンゲン菜	6.63	6.57
キャベツ	7.08	5.60
レタス	7.27	6.33
水菜	8.02	7.24
もやし	8.29	7.07
みつば	8.65	7.10
千切りキャベツ	2.66	2.48
カットレタス	3.27	2.96
カットレタス	5.09	4.41
彩り野菜ミックスサラダ	6.55	5.39
グリーンサラダ	7.13	6.21
ミックスサラダ	8.20	6.53
牛	1.55	1.99
豚	3.50	2.78
豚小間切れ肉	4.86	5.15
挽肉	5.47	4.89
鶏挽き肉	5.53	4.17
豚ロース	6.08	5.41
鶏もも肉	6.20	4.97
牛小間切れ肉	6.28	6.25

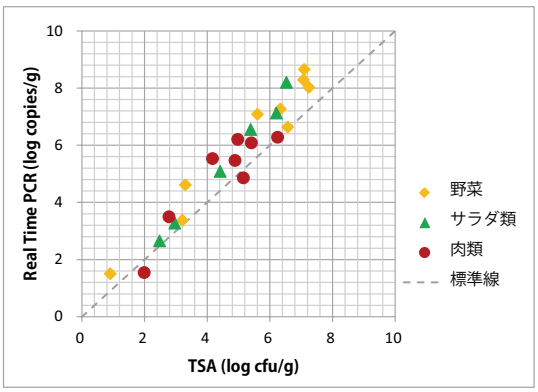


図 3. コピー数と菌数の相関（実検体）

TSA 塗沫培養の結果（菌数；CFU/g）を横軸に、リアルタイム PCR の結果（コピー数；copies/g）を縦軸にプロットした。TSA 塗沫培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方が菌数よりも 1 ～ 2 オーダー高めに算出される傾向にあった。純培養菌の場合に比べてコピー数と菌数の差異が大きい点に関しては、死菌や培養で検出されにくい菌種の存在が原因として考えられる。

VII. Appendix

検出実績のある菌種

本製品で検出実績のある菌種を表 3 に示します。

表 3. 検出実績のある菌種

J. Food Prot. 2010 Apr;**73**(4):670-9.（参考文献 4）より改変。10 ng の精製ゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行った場合、Ct 値が 20 以下となった菌種を下表に示す。

Bacterial strains[a]	Strain	Source	Accession number	*tuf*-qPCR amplification	*Ct*[b]
Gram negative					
Bacteroidetes					
Chryseobacterium formosense	FI55	Chub mackerel	AB472770	+	16.0
Flavobacterium hercynium	FI48	Spotted mackerel	AB472772	+	17.5
Flavobacterium johnsoniae	JCM 8514		AB472806	+	18.0
Sejongia antarctica	FI18	Spotted mackerel	AB472786	+	17.3
Sphingobacterium kitahiroshimence	FI23	Stone flounder	AB472789	+	16.9
γ -Proteobacteria					
Acinetobacter baumannii	JCM 6841		AB472793	+	15.8
Acinetobacter baumannii	FI63	Flatfish (meita)	AB472767	+	14.3
Aeromonas hydrophila	JCM 1027		AB472795	+	16.5
Aeromonas molluscorum	FI56	Horse mackerel	AB472768	+	15.0
Alteromonas macleodii	JCM 20772		AB472797	+	16.7
Citrobacter freundii	IAM 12471		AB472801	+	15.4
Colwellia aestuarii	FI04	Chub mackerel	AB472771	+	14.1
Enterobacter aerogenes	IAM 1183		AB472802	+	15.8
Erwinia carotovora	IAM 12633		AB472804	+	16.1
Escherichia coli	IAM 1137		AB472805	+	14.2
Klebsiella pneumoniae	IAM 1063		AB472808	+	15.3
Morganella morganii	ATCC 35200		AB472816	+	15.9
Photobacterium phosphoreum	FI59	Horse mackerel	AB472777	+	14.7
Proteus mirabilis	JCM 1669		AB472817	+	17.5
Pseudoalteromonas haloplanktis	FI01	Spotted mackerel	AB472780	+	14.9
Pseudomonas fluorescens	FI28	Stone flounder	AB472781	+	15.8
Psychrobacter immobilis	ATCC 43116		AB472818	+	16.8
Psychromonas arctica	FI26	Chub mackerel	AB472783	+	16.0
Rahnella aquatilis	JCM 1683		AB472819	+	15.9
Raoultella planticola	JCM 7251		AB472820	+	17.5
Salmonella serover Typhimurium	ATCC 13311		AB472822	+	15.1
Schineria larvae	FI13	Spotted mackerel	AB472788	+	15.0
Serratia marcescens	IAM 1104		AB472823	+	16.2
Shewanella frigidimarina	FI20	Spotted mackerel	AB472787	+	15.5
Shewanella japonica	JCM 21433		AB472824	+	15.8
Shewanella putrefaciens	NBRC 3908		AB492873	+	14.4

Vibrio diazotrophicus	FI52	Horse mackerel	AB472791	+	16.2
Vibrio parahaemolyticus	ATCC 17802		AB472827	+	16.3
Xanthomonas euvesicatoria	FI22	Chub mackerel	AB472792	+	15.5
Xanthomonas oryzae	JCM 20241		AB472828	+	19.6
Yersinia enterocolitica	ATCC 9610		AB472829	+	15.9
α-Proteobacteria					
Paracoccus denitrificans	FI34	Spotted mackerel	AB472779	+	17.0
β-Proteobacteria					
Alcaligenes faecalis	JCM 20522		AB472796	+	17.9
Burkholderia caledonica	JCM 21561		AB472799	+	16.3
Gram positives					
Bacilli					
Aerococcus sanguinicola	JCM 11549		AB472794	+	18.4
Bacillus subtilis	IAM 1076		AB472798	+	16.8
Brochothrix thermosphacta	NBRC 12167		AB492875	+	15.3
Carnobacterium divergens	JCM 5816		AB472800	+	15.7
Carnobacterium maltaromaticum	NBRC 15684		AB492874	+	16.2
Enterococcus faecalis	JCM 5803		AB472803	+	14.8
Lactococcus lactis	NRIC 1174		AB472811	+	18.1
Leuconostoc carnosum	JCM 9695		AB472812	+	17.9
Listeria monocytogenes	ATCC 15113		AB472813	+	18.4
Planomicrobium chinense	FI41	Chub mackerel	AB472778	+	16.0
Staphylococcus aureus	ATCC 12600		AB472826	+	16.1
Staphylococcus pasteuri	FI64	Flatfish (meita)	AB472790	+	16.0
Actinobacteria					
Rothia dentocariosa	JCM 3067		AB472821	+	16.1
Rothia nasimurium	FI43	Horse mackerel	AB472784	+	18.2
Salinibacterium amurskyense	FI36	Flatfish (meita)	AB472785	+	17.2

a： Classificaiton was based on the National Center for Biochnology Information taxonomy.
b： The cycle threhold value (Ct) for the reaction containing 10 ng of genomic DNA per reaction.

（参考） *tuf* 遺伝子の配列情報から検出可能と推測される菌種
GenBank に登録された 1,561 種のバクテリアゲノム配列（2011 年 11 月 21 日現在で最新の情報）から "tuf" または "elongation factor" という名前が付いている遺伝子配列 10,855 種を抽出し、本製品のプライマー配列に 100% マッチするものをリスト化しました。リストは、タカラバイオウェブカタログにて公開しています。
http://www.takara-bio.co.jp/cycleave/elongation_factor.xlsx

VIII. 関連製品

SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)（製品コード RR071A/B）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）

Enterobacteriaceae (*rplP* gene) Quantitative PCR Kit（製品コード RR241A）

IX. 参考文献

1）藤井建夫 : 水産食品の生菌数測定法 - Ⅰ培地組成，培養温度および平板法について. 東海水研報 , **118**, 71-79（1989）

2）福田 翼 , 古下 学 , 芝 恒男 : 鮮魚の 35℃培養公定法による生菌数と 20℃細菌培養法による生菌数の比較　*Journal of National Fisheries University* **60** (4) 183-188（2012）

3）里見正隆 , 及川寛 , 矢野豊 : 水産学シリーズ 141 水産物の品質・鮮度とその高度保持技術（中添純一 , 山中英明編）6. 微生物学的品質評価

4）Tanaka Y, Takahashi H, Simidu U, Kimura B.：Design of a new universal real-time PCR system targeting the tuf gene for the enumeration of bacterial counts in food. *J. Food Prot*. 2010 Apr; **73** (4) : 670-679.

X．注意

・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。*Premix Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201406Da